

# METABOLISMO DO CARBONO E LIMITAÇÕES BIOQUÍMICAS DA FOTOSÍNTESE EM FOLHAS DE DIFERENTES POSIÇÕES DA COPA DO CAFEIEIRO (*Coffea arabica* L.)

Wagner L. ARAÚJO; Roberto L. CUNHA; Elaine F. CELIN; Paulo C. DIAS; Gustavo A.B.K. de MORAES; Werner C. ANTUNES; Samuel C.V. MARTINS; Paulo C. CAVATTE; Fábio S. MATOS; Fábio M. DaMATTA, E-mail: fdamatta@ufv.br

Dep. Biologia Vegetal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 36570-000

## Resumo:

Neste trabalho, examinaram-se potenciais alterações do metabolismo do carbono, em folhas sujeitas a diferentes ambientes lumínicos, com o intuito de melhor compreender possíveis relações entre aquelas alterações e as causas da variação espacial diurna da fotossíntese, sob uma perspectiva bioquímica. Examinou-se, então, o curso diurno da concentração de carboidratos e do metabolismo do carbono em folhas de diferentes posições da copa de plantas de café cultivadas em campo. As atividades inicial e total da Rubisco, bem como seu estado de ativação, pouco variaram entre faces e estratos. As pequenas variações nas concentrações dos carboidratos e nas atividades de várias enzimas associadas com o metabolismo do carbono sugerem que o café apresenta uma baixa plasticidade para ajustar a sua maquinaria bioquímica para fixação do CO<sub>2</sub>, em resposta à redução da disponibilidade de luz. Verificou-se, também, que a maior atividade da invertase ácida foi acompanhada por maiores concentrações de hexoses e de amido, particularmente nas folhas superiores da face oeste. As maiores atividades da sintase da sacarose-fosfato e da fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato nas folhas superiores, em relação às das inferiores, devem estar fortemente associadas com as maiores taxas fotossintéticas observadas nas primeiras, de modo a garantir-lhes a manutenção da síntese e da exportação de fotoassimilados.

Palavras-chave: fotossíntese, metabolismo do carbono, carboidratos, café

## Carbon metabolism and biochemical limitations to photosynthesis in leaves of different positions in the canopy of the coffee tree (*Coffea arabica* L.)

### Abstract:

We evaluated potential alterations in diurnal course of carbohydrate concentration and carbon metabolism in leaves of different positions from the canopy of the coffee tree (*Coffea arabica* L.). Initial and total activities of Rubisco, as well as its activation state, little varied along the treatments. The small variations in carbohydrate concentrations as well as in the activities of several enzymes associated with carbon metabolism suggest that the coffee tree shows a low plasticity to adjust its biochemical apparatus for CO<sub>2</sub> fixation in response to decreasing light availability. In addition, we observed that the larger activity of acid invertase was followed by parallel increase of hexose and starch concentration, mainly in upper leaves. The greatest activities of sucrose-phosphate synthase and fructose-1,6-bisphosphatase in upper leaves appeared to be strongly associated with the greatest photosynthetic rates observed in these leaves in order to guarantee their abilities to maintain sucrose synthesis and export.

Key words: photosynthesis, carbon metabolism, carbohydrate, Coffee

### Introdução

A capacidade fotossintética varia amplamente em diferentes folhas de uma mesma planta, sendo frequentemente limitada por restrições difusivas e bioquímicas (Kozłowski & Pallardy, 1997). Diferenças existentes nas características bioquímicas e na estrutura física foliar exercem grande influência na capacidade fotossintética, resultando em limitações várias à fotossíntese (Guo et al., 2002). Além de limitações difusivas, alterações na atividade das enzimas da fase bioquímica da fotossíntese, bem como das enzimas do metabolismo dos carboidratos e do nitrogênio (Foyer et al., 1994; Kanechi et al., 1996; Paul & Driscoll, 1997), podem afetar significativamente a magnitude das taxas fotossintéticas. Com efeito, sob condições de irradiância saturante e temperatura moderada, a atividade catalítica da Rubisco limita, em última instância, a fixação do CO<sub>2</sub> (Sage, 2002).

Tem-se afirmado que as baixas taxas fotossintéticas do cafeeiro seriam decorrentes, em larga extensão, de limitações difusivas ao influxo de CO<sub>2</sub>, desde a atmosfera até os sítios de carboxilação (Silva et al., 2004). Por outro lado, sugere-se que as causas da variação espacial da fotossíntese, ao longo do dossel, seriam consequência, fundamentalmente, de limitações fotoquímicas, e não bioquímicas, à fotossíntese (Araújo, 2006). Neste trabalho, examinaram-se potenciais alterações do metabolismo do carbono, em folhas sujeitas a diferentes ambientes lumínicos, com o intuito de melhor compreenderem-se possíveis relações entre aquelas alterações e as causas da variação espacial diurna da fotossíntese, sob uma perspectiva bioquímica. Examinou-se, então, o curso diurno da concentração de carboidratos e do metabolismo do carbono em folhas de diferentes posições da copa de plantas de café cultivadas em campo.

### Material e Métodos

O experimento foi conduzido sob condições de campo, com plantas de café (*C. arabica* L. cv Catuaí Vermelho IAC 44), com 18 anos de idade, em Viçosa (20°45'S, 42°15'W, 650 m de altitude), Minas Gerais. As plantas vêm sendo cultivadas a pleno sol, sob espaçamento de 3,0 x 1,0 m, com uma planta por cova, e fileiras orientadas no sentido norte-sul.

O cafezal foi renovado, por meio de recepa, em 1996. Avaliaram-se folhas completamente expandidas, de posições azimutais semelhantes, do terceiro ou quarto par, a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, situados nas faces leste e oeste das plantas, utilizando-se de folhas dos terços superior e mediano inferior das plantas.

O experimento foi instalado sob o delineamento inteiramente casualizado, com quatro tratamentos dispostos em esquema fatorial 2 x 2 (duas faces e dois estratos – superior e inferior, em cada planta), com seis repetições. Cada unidade experimental consistiu-se de uma planta, avaliando-se uma folha por estrato e por face, em cada planta.

Amostras foliares (100 mg) foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, procedendo-se, *a posteriori*, às seguintes análises:

a) Extração e determinação de açúcares solúveis, amido e aminoácidos: as amostras foram submetidas à extração etanólica, a quente, determinando-se, na fração solúvel em etanol, os teores de hexoses (glicose + frutose), sacarose (Praxedes et al., 2006) e aminoácidos solúveis totais (DaMatta et al., 1999) e, na fração insolúvel, os teores de amido (Praxedes et al., 2006).

b) Extração e determinação de atividades enzimáticas: as amostras foram homogeneizadas com tampão de extração conforme descrito em detalhe por Praxedes et al. (2006). Todo o procedimento foi realizado a 4°C e os ensaios enzimáticos foram previamente otimizados para tempo de reação e volume de extrato. Atividades inicial ( $V_{\text{inicial}}$ ) e total ( $V_{\text{total}}$ ) da Rubisco foram avaliadas espectrofotometricamente, em extrato dessalinizado fresco. O estado de ativação da Rubisco foi calculado como a razão entre a atividade inicial e total (%). A atividade de SPS (velocidades máxima –  $V_{\text{max}}$  e seletiva –  $V_{\text{sel}}$ ) foi determinada como descrito em Praxedes et al. (2006), utilizando-se do extrato dessalinizado fresco. O estado de ativação da SPS foi calculado como a razão entre  $V_{\text{sel}}$  e  $V_{\text{max}}$  (%). As atividades da fosfatase da frutose-1,6-bisfosfato (FBPase), pirofosforilase da ADP-glicose (AGPase), invertase ácida (IA) e sintase da sacarose (SuSy) foram determinadas como descrito em Praxedes et al. (2006). Determinaram-se, ainda, as atividades da desidrogenase do NADP:gliceraldeído-3-P (NADP-GAPDH), fosforilase do amido (SPase) e desidrogenase do gliceraldeído-3-P (GAPDH), como descrito em Ronchi et al. (2006).

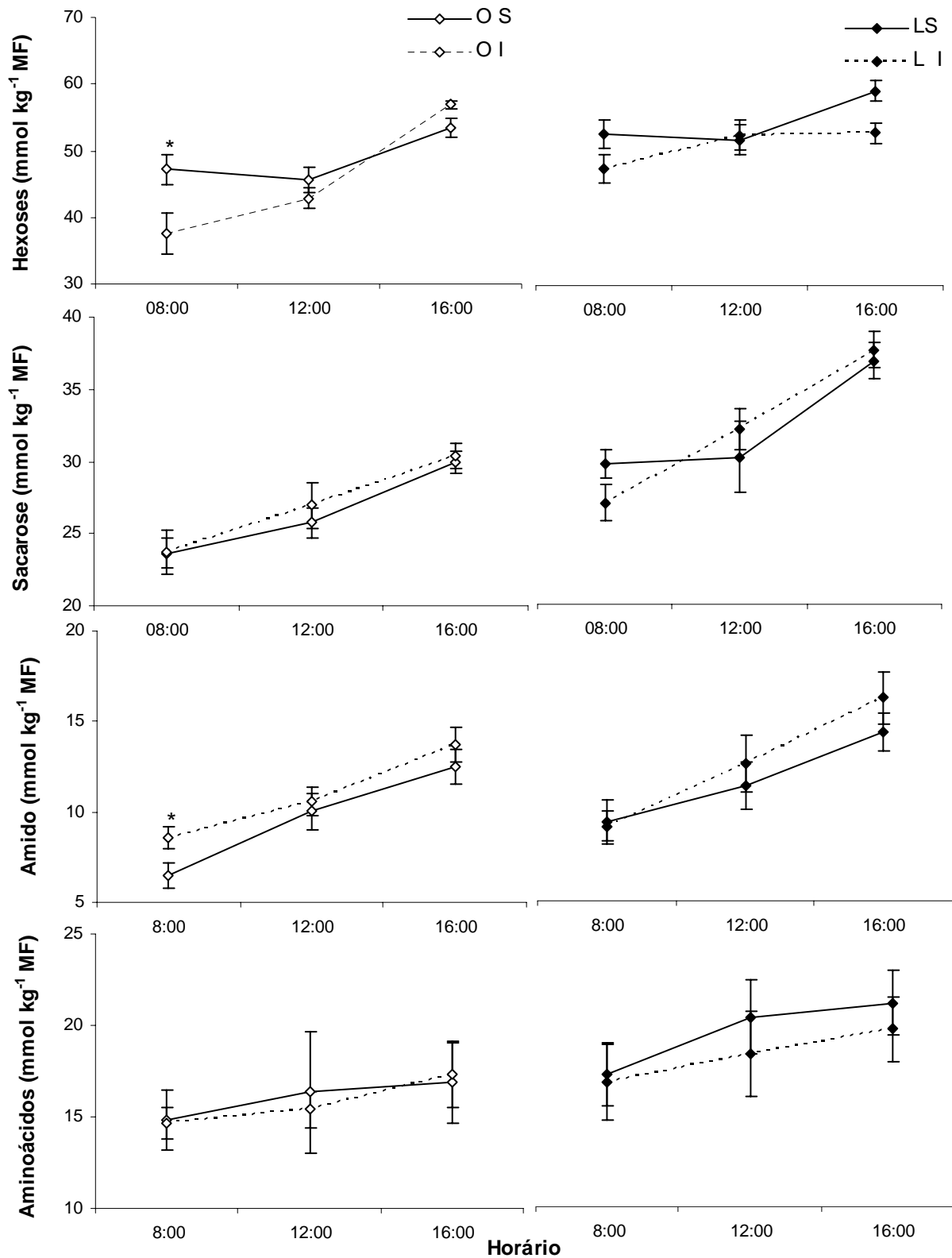
## Resultados e Discussão

As concentrações foliares de hexoses, sacarose e amido aumentaram discretamente ( $P \leq 0,10$ ), enquanto as de aminoácidos mantiveram-se praticamente constantes ao longo do dia (Figura 1). Somente às 8:00 h, as folhas superiores da face oeste apresentaram concentração de hexoses e de amido significativamente maior ( $P \leq 0,05$ ) que a das folhas inferiores dessa face (Figura 1). Houve uma tendência de a concentração de sacarose ser superior nas folhas da face leste, independentemente do estrato avaliado, ao longo do dia (Figura 1). O comportamento diurno das concentrações foliares de hexoses, sacarose, amido e aminoácidos é consistente com outras observações (Geingenberger & Stitt, 2000; Pérez et al., 2005) e sugere que as alterações discretas nos níveis de hexoses, ao longo do dia, não foram decorrentes de aumentos relativos na degradação de sacarose e/ou amido. Adicionalmente, a similaridade na concentração de sacarose entre folhas superiores e inferiores deve ter sido, então, reflexo de maiores taxas de exportação de fotoassimilados nas folhas superiores em relação às das inferiores.

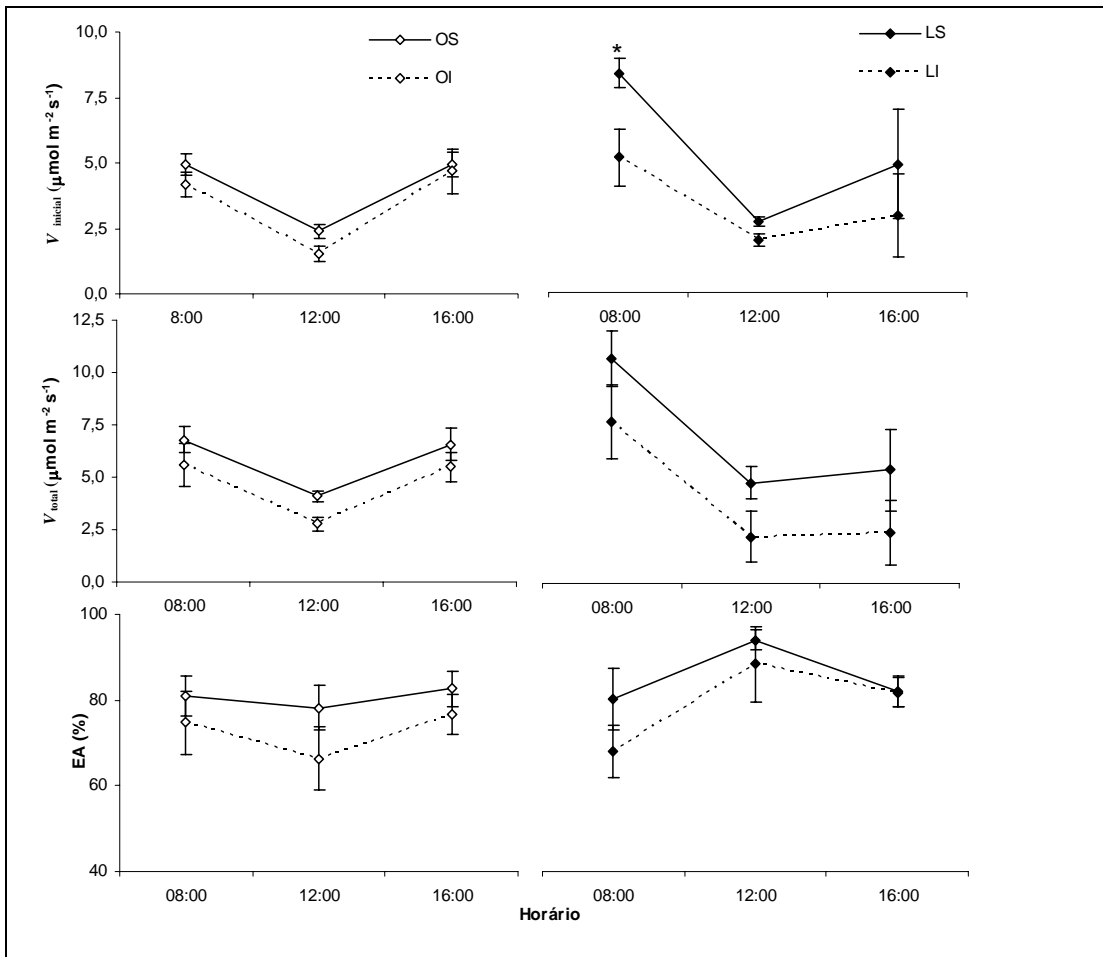
O padrão de variação diurna da atividade inicial ( $V_{\text{inicial}}$ ), atividade total ( $V_{\text{total}}$ ) e estado de ativação (EA) da Rubisco foi bastante similar entre faces e estratos (Figura 2). Todavia, as folhas superiores da face leste apresentaram tendência de maiores  $V_{\text{inicial}}$  e  $V_{\text{total}}$  que as demais folhas avaliadas ( $P \leq 0,10$ ) (Figura 2), mas sem alteração proporcional no EA da Rubisco (Figura 2). Apenas às 8:00 h as folhas superiores da face leste tiveram  $V_{\text{inicial}}$  significativamente maior ( $P \leq 0,05$ ) que a das folhas inferiores dessa face. De modo geral, as atividades catalíticas seletiva ( $V_{\text{sel}}$ ) e máxima ( $V_{\text{max}}$ ) da SPS foram maiores nas folhas superiores de ambas as faces, ao longo do dia, com significância estatística ( $P \leq 0,05$ ) às 12:00 e 16:00 h ( $V_{\text{sel}}$ ) e às 16:00 h ( $V_{\text{max}}$ ), ao passo que EA foi semelhante entre folhas superiores e inferiores, ao longo do dia (Figura 3). A redução observada em  $V_{\text{max}}$ , particularmente às 12:00 h, deve ter sido largamente compensada pelo aumento no EA, também observado nesse horário, de modo a manter o fluxo de síntese de sacarose. Os incrementos paralelos nas concentrações de amido, sem alterações proporcionais das atividades de AGPase e SPase (dados não mostrados) e de sacarose sugerem que não houve mobilização preferencial do carbono fixado para a síntese de um daqueles compostos. Considerando-se que as taxas de exportação de sacarose são intimamente ligadas à atividade da SPS (Stitt, 1994) e que não houve diferenças expressivas de concentração de sacarose entre estratos, é plausível sugerir-se que a exportação de sacarose tenha sido maior nas folhas dos estratos superiores.

A exemplo da Rubisco, praticamente não houve diferenças significativas de atividades das demais enzimas do metabolismo de carboidratos, ao compararem-se folhas dos estratos superiores com as dos inferiores, independentemente da face avaliada. De maneira geral, as atividades das enzimas AGPase, SuSy, SPase, GAPDH e NADP-GAPDH pouco ou nada variaram ao longo do dia, não se evidenciando, também, diferenças marcantes de atividade entre as faces, dentro de cada estrato avaliado (dados não mostrados), excetuando-se a tendência de as folhas superiores apresentarem maiores atividades que as folhas inferiores.

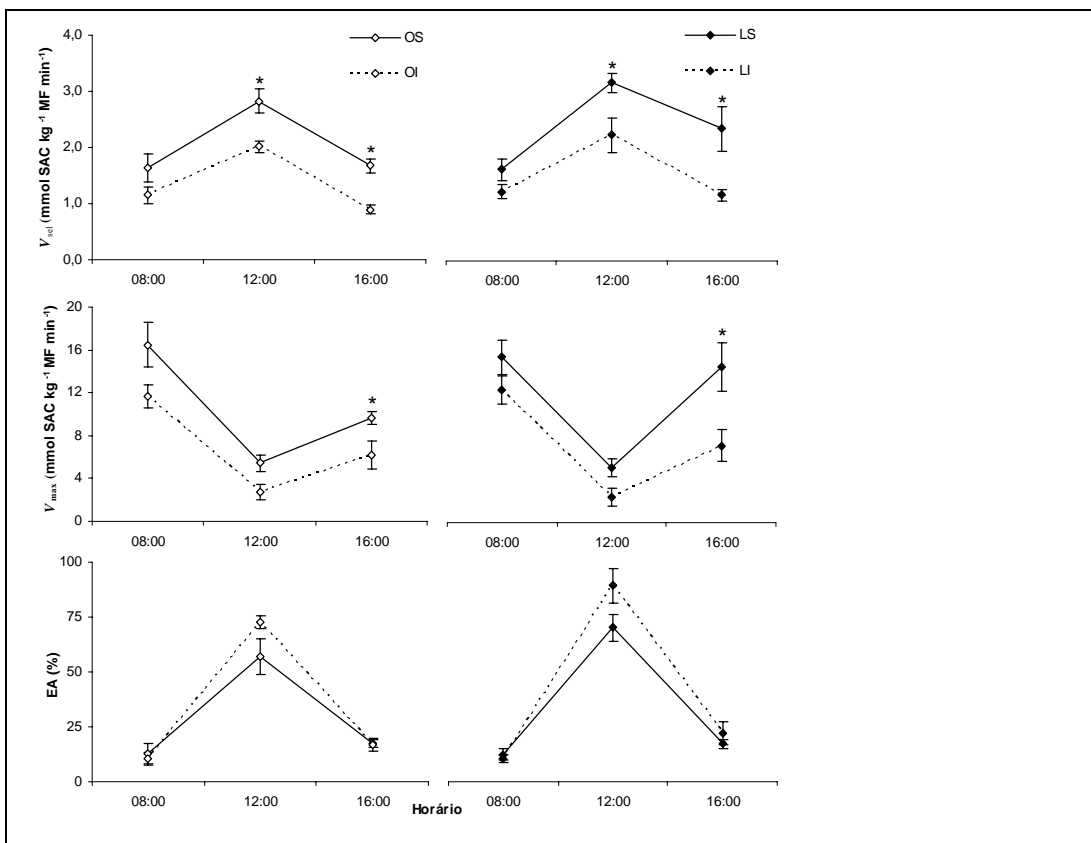
A atividade da FBPase foi, em média, 28% maior ( $P \leq 0,05$ ) nas folhas superiores, quando comparada à das folhas inferiores, em ambas as faces (dados não mostrados), ao longo do dia. Dessa maneira, o incremento na atividade da SPS, especialmente  $V_{\text{sel}}$ , em paralelo ao aumento da FBPase, nas folhas superiores, indicam que a síntese de sacarose tenha sido maior nessas folhas que nas inferiores. A atividade da IA foi 100% e 115% maior ( $P \leq 0,05$ ) nas folhas superiores em relação às inferiores das faces oeste e leste, respectivamente, às 8:00 h, e similar nos demais horários avaliados (dados não mostrados). Verificou-se, também, que a maior atividade da IA foi acompanhada por maiores concentrações de hexoses e de amido, particularmente nas folhas superiores da face oeste.



**Figura 1:** Concentrações foliares de hexoses, sacarose, amido e aminoácidos em plantas de café cultivadas em campo. As medições foram realizadas em folhas situadas nas faces oeste (O, símbolo vazio) e leste (L, símbolo cheio) dos terços superior (S, linha cheia) e mediano inferior (I, linha tracejada) do dossel. Valores representam a média  $\pm$  erro-padrão ( $n=6$ ). Asterisco (\*) denota diferenças entre folhas superiores e inferiores, dentro de um mesmo horário ( $P \leq 0,05$ )



**Figura 2:** Atividade inicial ( $V_{inicial}$ ), atividade total ( $V_{total}$ ) e estado de ativação (EA) da Rubisco, em plantas de café cultivadas em campo. Detalhes adicionais na Figura 1.



**Figura 3:** Atividade seletiva ( $V_{sel}$ ), atividade máxima ( $V_{max}$ ) e estado de ativação (EA) da sintase da sacarose-fosfato (SPS), em plantas de café cultivadas em campo. Detalhes adicionais na Figura 1

## Conclusões

Em síntese, as limitações não-estomáticas à fotossíntese ao longo do dia, observadas neste trabalho, não podem ser atribuídas à retroinibição metabólica da fotossíntese, dadas as pequenas variações observadas nas concentrações foliares de sacarose, amido e de aminoácidos. Os resultados sugerem, ainda, que menor atividade da Rubisco nas folhas inferiores tenha sido compensada por um aumento em EA e as maiores atividades da SPS e da FBPase nas folhas superiores, em relação às das inferiores, devem estar fortemente associadas com as maiores taxas fotossintéticas observadas nas primeiras, de modo a garantir-lhes a manutenção da síntese e da exportação de fotoassimilados.

## Referências

- DaMatta FM, Amaral JAT, Rena AB (1999) Growth periodicity in trees of *Coffea arabica* L. in relation to nitrogen supply and nitrate reductase activity. *Field Crops Research* 60: 233-229.
- Foyer CH, Lescure JC, Lefebvre C, Morot-Gaudry JF, Vicentz M, Vaucheret H (1994) Adaptation of photosynthetic electron transport, carbon assimilation, and carbon partitioning in transgenic *Nicotiana plumbaginifolia* plants to change in nitrate reductase activity. *Plant Physiology* 104: 171-178.
- Geigenberger P, Stitt M (2000) Diurnal changes in sucrose, nucleotides, starch synthesis and *AGPS* transcript in growing potato tubers that are suppressed by decreased expression of sucrose phosphate synthase. *The Plant Journal* 23: 795-806.
- Guo J, Jermyn WA, Turnbull MH (2002) Diurnal and seasonal photosynthesis in two asparagus cultivars with contrasting yield. *Crop Science* 42: 399-405.
- Kanechi M, Uchida N, Yasuda T, Yamaguchi T (1996) Non-stomatal inhibition associated with inactivation of Rubisco in dehydrated coffee leaves under unshaded and shaded conditions. *Plant and Cell Physiology* 37: 455-460.
- Kozłowski TT, Pallardy SG (1997) *Physiology of Woody Plants*. San Diego: Academic Press. 411p.
- Paul MJ, Driscoll SP (1997) Sugar repression of photosynthesis: the role of carbohydrates in signaling nitrogen deficiency through source sink-imbalance. *Plant, Cell and Environment* 20: 110-116.
- Pérez P, Morcuende R, Martín del Molino I, Martínez-Carrasco R (2005) Diurnal changes of Rubisco in response to elevated CO<sub>2</sub>, temperature and nitrogen in wheat grown under temperature gradient tunnels. *Environmental and Experimental Botany* 53: 13-27.
- Praxedes SC, DaMatta FM, Loureiro ME, Ferrão MAG, Cordeiro AT (2006) Effects of long-term soil drought on photosynthesis and carbohydrate metabolism in mature robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre var. *kouillou*) leaves. *Environmental and Experimental Botany* 56: 263-273.
- Sage RF (2002) Variation in the  $k_{cat}$  of Rubisco in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature. *Journal of Experimental Botany*. 53: 609-620.
- Silva EA, DaMatta FM, Ducatti C, Regazzi AJ, Barros RS (2004) Seasonal changes in vegetative growth and photosynthesis in Arabica coffee trees. *Field Crops Research* 89: 349-357.
- Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas- SAEG. (1997) version 7.1. Viçosa: Fundação Arthur Bernardes.
- Stitt M (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 153-185.
- Stitt M, Lilley RMC, Gerhard R, Heldt HW (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. *Methods in Enzymology* 174: 518-552.